

DOI: 10.19663/j.issn2095-9869.20220303003

http://www.yykxjz.cn/

杜博博, 姚璐, 李治平, 董迎辉, 任建峰. 缢蛏 Toll 样受体家族基因全基因组水平鉴定及其在弧菌刺激下的表达分析. 渔业科学进展, 2023, 44(4): 155-166

DU B B, YAO L, LI Z P, DONG Y H, REN J F. Genome-wide identification of Toll-like receptor family genes in *Sinonovacula constricta* and their expression in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. Progress in Fishery Sciences, 2023, 44(4): 155-166

缢蛏 Toll 样受体家族基因全基因组水平鉴定 及其在弧菌刺激下的表达分析*

杜博博^{1,3} 姚璐^{1,3} 李治平^{1,3} 董迎辉² 任建峰^{1,3}①

(1. 上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际联合研究中心 上海 201306;

2. 浙江万里学院生物与环境学院 浙江省水产种质资源高效利用技术研究重点实验室 浙江 宁波 315000;

3. 上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室 上海 201306)

摘要 缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国传统的四大海水养殖贝类之一, 养殖过程中易受病原菌感染而造成大量死亡和经济损失。Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)是目前研究最多的模式识别受体, 在无脊椎动物的先天性免疫中发挥着重要作用。研究缢蛏 TLR 分子特征及其免疫功能对预防和控制病原菌感染至关重要。本研究从缢蛏基因组序列中鉴定出 42 个 TLR 基因(*ScTLR*), 其中, 33 个编码典型的 TLR 蛋白, 其他 9 个为 TLR 样蛋白。根据蛋白结构域特点, 将典型的 TLR 蛋白分为 2 大类 4 个亚类, 一类为多半胱氨酸簇 TLR (*mccTLR*), 包括 1 个 P 型 TLR 和 7 个 sPP 型 TLR; 另一类为单半胱氨酸簇 TLR (*sccTLR*), 包括 16 个 sP 型 TLR 和 9 个 Ls 型 TLR。与其他 9 种软体动物 TLR 基因的类型和数目比较结果显示, 缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 TLR, 起源古老的 *mccTLR* 类群在软体动物中没有大规模的扩张, 而起源较晚的 *sccTLR* 类群却发生了大规模的扩张。荧光定量 PCR 分析显示, 6 种 *ScTLR* 在检测的 7 种组织中普遍表达, 且在血细胞、鳃和肝胰腺组织中高表达。最后, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)胁迫 12 h 和 48 h 的缢蛏鳃和肝胰腺转录组数据分析显示, 副溶血弧菌感染前后 9 个 TLR 基因在鳃或肝胰腺中的表达量发生显著变化, 6 个基因(*ctg118.25*、*ctg118.26*、*ctg356.25*、*ctg774.6*、*ctg681.6* 和 *ctg1513.5*)在感染 12 h 或 48 h 后的鳃组织中表达差异显著, 前 5 个基因表达量上调, 仅 *ctg1513.5* 表达量下调; 3 个基因(*ctg467.9*、*ctg2496.3* 和 *ctg903.17*)在感染 12 h 或 48 h 后的肝胰腺中表达差异显著, 其中, *ctg467.9* 和 *ctg2496.3* 表达量下调, *ctg903.17* 表达量上调。综上所述, 本研究结果将为深入探讨不同 TLR 基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供研究基础。

关键词 缢蛏; Toll 样受体; 弧菌刺激; 表达分析

中图分类号 K826.15 文献标识码 A 文章编号 2095-9869(2023)04-0155-12

贝类作为一种无脊椎动物, 体内不存在特异性免疫细胞和相应的抗体, 主要依靠先天性免疫系统发挥免疫功能。先天性免疫反应的第一步是通过模式识别受体(pattern recognition receptor, PRR)来感知病原体

* 宁波市科技创新 2025 重大专项(2019B10005)资助。杜博博, E-mail: 1243146339@qq.com

① 通信作者: 任建峰, 副研究员, E-mail: jfren@shou.edu.cn

收稿日期: 2022-03-03, 收修改稿日期: 2022-04-11

相关的分子模式(pathogen associated molecular pattern, PAMP), 启动特定的信号通路, 抵御病原体的入侵(Medzhitov, 2007)。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)是研究最广泛和深入的模式识别受体之一, 在先天性免疫系统中发挥着重要功能。果蝇(*Drosophila melanogaster*)的Toll-1是第一个被发现的TLR, 其通过激活转录因子NF- κ B信号通路来指导胚胎的早期发育(Medzhitov *et al.*, 1998), 随后证实Toll基因在果蝇抗感染免疫方面也发挥重要的作用(Lemaitre *et al.*, 1997)。典型的TLR蛋白包括3个主要的结构域, 一是富含亮氨酸重复序列(leucine-rich repeat, LRR)的胞外结构域; 二是跨膜结构域(transmembrane domain, TMD); 三是含有TIR (Toll/interleukin-1 receptor)的胞内结构域。根据其胞外结构域的变化, TLR可分为两大类: 单半胱氨酸簇TLR (single cysteine cluster TLR, sccTLR)和多半胱氨酸簇TLR (multiple cysteine cluster TLR, mccTLR), sccTLR的特征是在LRR的C-末端存在1个与细胞膜并列的半胱氨酸簇, 而mccTLR胞外结构域具有2个或更多的半胱氨酸簇(Leulier *et al.*, 2008)。Brennan等(2018)推测, mccTLR起源于刺胞动物门(Cnidaria), 而sccTLR类群在软体动物门(Mollusca)显著扩张, TLR在低等生物体中具有免疫和发育双重功能。

TLR基因作为先天免疫的重要组成部分, 在脊椎动物中受到广泛研究, 但海洋无脊椎动物TLR的分子特征和功能的研究仍处于初步阶段。相对于脊椎动物, 海洋无脊椎动物基因组中TLR数目均存在不同程度的扩张现象。前期的研究表明, 在文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)和海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)中分别鉴定出72个和222个TLR(Satake *et al.*, 2012); Toubiana等(2013)在地中海贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)中通过转录组数据鉴定出23个TLR, 其中, 3个TLR为mccTLR, 其他TLR均属于sccTLR; Zhang等(2015)从长牡蛎(*Crassostrea gigas*)基因组中注释得到83个TLR, 根据蛋白结构域的特点, 将其分为V、P、sP、sPP和Ls共5种类型, 其中19个TLR在病毒和细菌的刺激下差异表达; Gorbushin(2020)从厚壳玉黍螺(*Littorina littorea*)血细胞转录组中鉴定出43个TLR, 根据TLR蛋白的最新分类标准, 将它们分为V型和Twin-TIR型两类; 除此之外, Ren等(2021)从菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)转录组文库中鉴定出8个TLR, 并将其分为V、P、sP和Ls型。

贝类生活在水体中, 易受病原菌的感染, 如弧菌(*Vibrio*)和病毒对贝类养殖产业产生极大危害并造成严重的经济损失(张颖雪等, 2020; 白昌明等, 2021)。缢蛏(*Sinonovacula constricta*)是我国传统的四大海水养殖贝类之一, 广泛分布于西太平洋沿岸的潮间带和河口水域(Zhao *et al.*, 2017)。然而, 随着养殖环境恶化及各种细菌病毒病的暴发, 给缢蛏养殖产业带来较大的经济损失, 因此, 深入了解缢蛏的免疫防御机制有利于制定有效的抗病策略。先前的研究表明, 副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)感染后, 缢蛏鳃和肝胰腺组织中部分免疫相关的基因发生了应答(Zhao *et al.*, 2017); 急性高温胁迫下缢蛏的免疫反应也会发生很大的变化(孔祥辉等, 2022)。然而, 对缢蛏免疫相关信号通路的研究仍相对较少, 仅少数免疫基因被克隆和表征, 如组织蛋白酶(Niu *et al.*, 2013a、b)、纤维蛋白原相关蛋白(Wu *et al.*, 2021)、肽聚糖识别蛋白(Meng *et al.*, 2022)以及C-型凝集素(Xu *et al.*, 2020)等。本文通过对缢蛏全基因组中TLR基因的鉴定和分类、其组织表达模式的分析以及副溶血弧菌感染前后其在鳃和肝胰腺免疫组织的表达变化研究, 进一步了解缢蛏TLR基因的扩张现象, 并为深入探讨不同TLR基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 缢蛏TLR基因鉴定

基于已有的缢蛏全基因组数据(Dong *et al.*, 2020), 对TLR家族基因进行全基因组范围内的鉴定。从Pfam蛋白质家族数据库(<http://pfam.xfam.org/>)查询TIR结构域(PF01582)和LRR结构域(PF13855)的Pfam编号, 基于缢蛏全基因组编码基因蛋白序列的InterProScan分析结果文件, 根据Pfam编号, 对同时包含LRR和TIR两种结构域的蛋白编码基因进行检索。利用检索获得的基因蛋白序列作为种子序列, 通过TBLASTN程序在全基因组DNA序列内进一步鉴定出基因组注释过程中未正确注释出的TLR基因。通过SMART网站(<http://smart.embl-heidelberg.de/>)对已鉴定的TLR蛋白结构域进一步分析和确认, 结构域对比结果阈值设定为 $E < 1 \times 10^{-5}$ 。完整的TLR蛋白序列应该至少由LRR和TIR两个结构域组成, 且具有较高的序列保守性。对于蛋白结构域不完整的TLR基因, 利用Softberry网站(<http://www.softberry.com/>)

的 FGENESH⁺ 在线基因预测程序, 利用基因组序列对其基因结构进行校正。基于校正后的基因序列进行数据分析(缢蛏 *TLR* 基因 cDNA 和蛋白序列见 <https://figshare.com/s/958beb427d81530b78a0>)。

1.2 软体动物 *TLR* 家族基因的比较和系统发育分析

对软体动物 4 个纲 9 个代表物种[多板纲: 石鳖 (*Acanthopleura granulata*); 头足纲: 中国真蛸 (*Octopus vulgaris*); 腹足纲: 加州海兔 (*Aplysia californica*)、福寿螺 (*Pomacea canaliculata*)、霸王莲花青螺 (*Lottia gigantea*); 双壳类: 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*)、马氏珠母贝 (*Pinctada martensi*)、美洲牡蛎 (*Crassostrea virginica*)、长牡蛎]的 *TLR* 家族基因进行分类, 并与缢蛏 *TLR* 基因分类进行比较。*TLR* 基因分类基于其蛋白结构域序列, 根据 Gerdol 等(2017)提出的方法进行。本研究 9 种软体动物校正的 *TLR* 蛋白序列参考王璐等(2021)。

获取缢蛏全长 *TLR* 蛋白序列中保守的 TIR 结构域, 利用 ClustalW (Thompson *et al*, 1994)对 TIR 蛋白序列进行多重序列比对, 然后再利用 MEGA7 软件 (Kumar *et al*, 2016) 基于邻接法 (neighbor-joining method, NJ)构建系统发育树, 使用 P-distance 模型及 Bootstrap 抽样自展法估算进化树分支节点的支持率, 重复数为 1 000。系统发育树结果用 iTOL (<https://itol.embl.de/index.shtml>) (Letunic *et al*, 2016)进行可视化。

1.3 实验样品与组织收集

本实验所用缢蛏的平均壳长为(6.7±0.2) cm, 湿重为(12.0±0.5) g, 采自浙江省台州市三门县。实验前, 将缢蛏在水温为 20 °C、盐度为 20 的海水中暂养 1 周, 然后随机挑选 9 只健康个体, 用 1 mL 的注射器从闭壳肌采集血淋巴, 立即于 4 °C 800 g 离心 10 min, 弃上清液, 获得血细胞。加入 1 mL TRIzol (诺唯赞 R401-01)重悬血细胞, 提取血细胞总 RNA。然后再收集外套膜、斧足、水管、鳃、性腺和肝胰腺等组织样品, 放入 RNase-free 的离心管中, 立即液氮速冻, 然后放入-80 °C 冰箱保存备用。将 60 只规格一致、暂养 1 周的缢蛏随机分为 2 组, 即细菌攻毒组和对照组, 每组各 30 只。用 1 mL 注射器向攻毒组缢蛏的斧足中注射 100 μL PBS 稀释后浓度为 1×10⁸ CFU/mL 的副溶血弧菌, 对照组注射相同体积的 PBS 无菌缓冲液。于注射后 12 h 和 48 h 后分别从实验组和对照组随机选取 6 只缢蛏, 收集鳃和肝胰腺组织, 提取总 RNA, 每组选取 3 只缢蛏合格 RNA 用于转录组文库的构建和测序。

1.4 RNA 的提取

使用 TRIzol (诺唯赞 R401-01)提取缢蛏各组织总 RNA, NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, 美国)和 1% 琼脂糖凝胶电泳分别检测其浓度和完整性。将提取的 RNA 放入-80 °C 冰箱保存备用。

1.5 实时荧光定量 PCR 分析

为探究缢蛏 *TLR* 基因在成体组织中的表达模式, 从 33 个结构域完整的 *TLR* 基因中随机选取 6 个基因, 分别为 mcc*TLR* 类中的 *ctg294.3* (sPP 型)、*ctg1017.8* (sPP 型)和 *ctg1228.10* (P 型)及 scc*TLR* 类中的 *ctg1513.3* (Ls 型)、*ctg5741.1* (sP 型)和 *ctg169.28* (Ls 型)。利用实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)技术对其在健康成体组织中的表达水平进行定量分析。具体步骤如下: 将缢蛏 7 种组织的 RNA, 分别利用 HiScript[®] II Q RT SuperMix for qPCR (诺唯赞 R223-01)试剂盒反转录成 cDNA, 然后以 18S rRNA 为内参基因, 进行 qRT-PCR 定量(表 1)。定量反应利用 ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 预混液(诺唯赞 Q712), 在 Roche LightCycler[®] 480 II 荧光定量 PCR 系统上进行。反应体系: 10 μL 2× SYBR qPCR Master Mix, 0.4 μL 正向引物(0.4 μmol/L), 0.4 μL 反向引物(0.4 μmol/L), 2 μL cDNA 模板, ddH₂O 补至 20 μL。采用两步法程序进行反应: 95 °C 预变性 30 s; 95 °C 变性 10 s, 60 °C 退火和延伸 30 s, 进行 40 个循环。健康缢蛏组织 *TLR* 基因的表达模式分析, 以血细胞中阈值循环数(*C_T* 值)作为对照, 计算 *TLR* 在其他组织(实验组)中的表达水平。将血细胞(对照组)和其他组织(实验组)的 mRNA 表达水平标准化到同一样本的 18S rRNA 基因表达水平。实验重复 3 次, 以 2^{-ΔΔCT} 法计算基因的表达量。使用 GraphPad Prism 8.4.3 软件进行单因素方差分析 (one-way ANOVA)及作图, 其中, *P*<0.05 表示差异显著, *P*>0.05 表示差异不显著。

1.6 弧菌感染后缢蛏 *TLR* 基因响应分析

将转录组测序得到的干净读段(clean reads)使用 HISAT2 软件将比对到缢蛏参考基因组上 (Mortazavi *et al*, 2008), 然后, 根据比对结果利用 FeatureCounts 统计每个基因上的读段数目 (Liao *et al*, 2014)。最后, 利用 DESeq2 进行不同样品组间差异基因表达分析 (Love *et al*, 2014), 从分析结果中检索 42 个 *TLR* 基因的表达量数据绘制热图, 根据差异表达基因绘制维恩图。差异表达标准为 |log₂FoldChange| >1 且 *P*<0.05 (*TLR* 基因在不同样品中表达量的具体数值和统计分析结果见 <https://figshare.com/s/958beb427d81530b78a0>)。

表1 实时荧光定量PCR引物
Tab.1 Sequence of primers used for qRT-PCR

基因编号 Gene ID	引物序列 Primer sequences (5'~3')	用途 Purpose
<i>ctg169.28</i>	F: GACGGCAACTGGATAAATAA R: TTGACAGAAGGAGGTGAAGC	qRT-PCR
<i>ctg294.3</i>	F: TACCCGAAGCCGATTATACGA R: TACCAACCAGCACTTGACGA	qRT-PCR
<i>ctg1228.10</i>	F: ATGTTCTATTACCTCGTCTTC R: TGA CTCTATGCTTCTTTCT	qRT-PCR
<i>ctg5741.1</i>	F: CTGGAACGATTGGAAAAGTA R: CATCAAGGTTGCACAAGACA	qRT-PCR
<i>ctg1513.5</i>	F: AACTGGACTAATTGCGAACC R: GTCGGAAGTATTGTAGAAGAT	qRT-PCR
<i>ctg1017.8</i>	F: ATTGCATTGCGATTGTTATTCC R: GACAACACTCGGCACCACCA	qRT-PCR
18S rRNA	F: TCGGTTCTATTGCGTTGGTTTT R: CAGTTGGCATCGTTTATGGTCA	内参 Reference

2 结果与分析

2.1 缢蛭 TLR 家族基因全基因组水平的鉴定

基于氨基酸序列的相似性和蛋白结构域的组成,本研究在缢蛭全基因组序列中共鉴定出 42 个 TLR 基因(表 2)。通过对结构域编码不完整的 TLR 基因利用 FGENESH⁺ 基因预测程序在基因组序列层面进行校正,并结合 SMART 网站对 TLR 蛋白结构域分析,结果显示,33 个 TLR 蛋白具有 LRR 结构域、跨膜结构域和胞内 TIR 结构域,为典型的完整 TLR 蛋白,其他 9 个为 TLR 样蛋白,其中,4 个 TLR 蛋白缺乏胞内 TIR 结构域,2 个缺乏跨膜结构域,1 个缺乏 LRR 结构域,其他 2 个缺乏 TIR 和 TM 结构域或 LRR 和 TM 结构域。

2.2 缢蛭 TLR 家族基因的分类和系统演化

基于胞外 LRR 结构域的特征,软体动物 TLR 可以分为两大类: sccTLR 和 mccTLR,并进一步细分为 6 个亚类(图 1),其中, sccTLR 包括 3 个亚类: (1) V 型 TLR,经典的 sccTLR,其 N 端和 C 端的 LRR 结构域(LRR-NT 和 LRR-CT)位于 LRR 两侧; (2) sP 型 TLR,类似于 V 型 TLR,但略短; (3) Ls 型 TLR,无 LRR-NT 结构域,胞外为不规范或退化的 LRR 结构域。mccTLR 也分为 3 个亚类: (4) P 型 TLR,类似于果蝇 *Toll* 基因,其特征是典型的 2 个 LRR 结构域被 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域分隔; (5) sPP 型 TLR,类似于 P 型 TLR,但略短; (6) Twin-TIR 型 TLR,类似

于 P 型和 sPP 型 TLR,但具有 2 个连续的 TIR 结构域(Gerdol *et al*, 2017)。此外,对于缺乏 LRR 或者 TIR 结构域的蛋白统称为 TLR 样蛋白(TLR-like protein)(Brennan *et al*, 2018)。缢蛭 42 个 TLR 基因包括 25 个 sccTLR、8 个 mccTLR 和 9 个 TLR 样蛋白(表 2)。为了更好地研究缢蛭 TLR 家族基因的结构和系统演化关系,将缢蛭 33 个完整 TLR 蛋白基于 TIR 结构域序列构建系统发育树。根据 TLR 结构域注释及系统发育分析发现,缢蛭的 33 个完整 TLR 分属在 4 个亚类,分别为 P 型、sPP 型、sP 型和 Ls 型,其中, sP 和 Ls 型 TLR 分散于进化树不同的亚支(图 2)。

2.3 软体动物 TLR 的分类比较

基于 TLR 蛋白结构域特点,并根据 Gerdol 等(2017)提出的 TLR 分类方法,进行包括缢蛭在内的 10 种软体动物 TLR 家族基因分类和数目比较(表 3)。从表 3 可以看出,缢蛭中不存在 V 型和 Twin-TIR 型 TLR,且 sccTLR 数目多于 mccTLR,其中, sccTLR 中的 sP 型 TLR 最多,有 16 个;而 mccTLR 中的 P 型 TLR 与大多数软体动物一样数目较少,仅有 1 个。此外,缢蛭中存在 9 个 TLR 样蛋白,这在大部分软体动物中都有发现,如长牡蛎和马氏珠母贝中分别有 6 个和 11 个。通过对 10 种软体动物 TLR 家族基因分类和数目比较可以看出,不同软体动物的 TLR 基因的数目存在较大差异,腹足纲的霸王莲花青螺仅有 16 个 TLR,而双壳纲的美洲牡蛎却有高达 130 个 TLR;作为同属的长牡蛎和美洲牡蛎,其 TLR 的数目也存在较大差异,长牡蛎有 83 个 TLR;除此之外, Ls 型和 sP 型 TLR 在软体动物中占主导地位,与其他类型的 TLR 相比数目明显偏多,且存在于脊椎动物中的 V 型 TLR 在部分软体动物中也存在,但数量较少,在 1~4 个之间。

2.4 缢蛭 TLR 基因在成体组织中的表达特征

TLR 基因成体组织表达特征分析结果显示,6 个 TLR 基因在所检测的 7 个组织中,包括血细胞、鳃、肝胰腺、性腺、斧足、外套膜和水管中均有不同程度的表达(图 3)。其中, *ctg294.3* (sPP 型)、*ctg1017.8* (sPP 型)和 *ctg1513.3* (Ls 型) 3 个基因均在血细胞中显著高表达($P < 0.05$),其次是鳃,而在水管、外套膜和性腺等组织中表达量较低($P > 0.05$)。除血细胞外, *ctg294.3* 和 *ctg1513.3* 的表达量在其他组织间差异不显著,而 *ctg1017.8* 鳃组织与其他组织差异较显著($P < 0.05$)。 *ctg5741.1* (sP 型)和 *ctg169.28* (Ls 型) 2 个基因分别在肝胰腺和鳃中表达量最高($P < 0.05$),在斧足和性腺中

表 2 缙蛭全基因组中鉴定出的 *TLRs*
Tab.2 *TLRs* identified in the genome of *Sinonovacula constricta*

TLR 类型 TLR type	TLR 亚类 TLR subtype	基因编号 Gene ID	蛋白长度 Protein length /aa	结构域 Domain structure		
mccTLR	P 型	<i>ctg1228.10</i>	1 213	SP-LRR(18)-NT-LRR(3)-TM-TIR		
		<i>ctg1017.8</i>	755	LRR(5)-CT-NT-LRR(2)-CT-TM-TIR		
	sPP 型	<i>ctg294.1</i>	362	LRR(8)-CT-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg294.3</i>	710	LRR(2)-CT-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg1017.9</i>	269	SP-LRR(5)-CT-NT-LRR(2)-CT-TM-TIR		
		<i>ctg1350.1</i>	1 155	SP-LRR(5)-CT-NT-LRR-CT-TM-TIR		
		<i>ctg356.25</i>	531	CT-NT-CT-TM-TIR		
		<i>ctg2.41</i>	601	CT-NT-LRR(1)-CT-TIR		
		sccTLR	sP 型	<i>ctg774.6</i>	750	SP-LRR(2)-NT-LRR-TM-TIR
				<i>ctg899.7</i>	835	SP-LRR(1)-NT-LRR(1)-TM-TIR
<i>ctg368.18_20</i>	774			SP-LRR(2)-NT-TM-TIR		
<i>ctg903.17</i>	224			SP-NT-LRR(7)-TM-TIR		
<i>ctg255.18</i>	564			LRR(6)-TM-TIR		
<i>ctg414.46</i>	880			SP-LRR(8)-TM-TIR		
<i>ctg1193.4</i>	864			SP-LRR(9)-TM-TIR		
<i>ctg58.57</i>	606			SP-LRR(2)-TM-TIR		
<i>ctg730.10</i>	251			LRR(1)-TM-TIR		
<i>ctg58.54</i>	438			SP-LRR(2)-TM-TIR		
<i>ctg118.25</i>	607			LRR(1)-TM-TIR		
<i>ctg118.26</i>	393			LRR-TM-TIR		
<i>ctg2496.3</i>	408			CT-TM-TIR		
<i>ctg467.9</i>	705			SP-NT-LRR(7)-CT-TM-TIR		
<i>ctg5741.1</i>	705			SP-NT-LRR(7)-CT-TM-TIR		
<i>ctg467.8</i>	705			SP-NT-LRR(5)-CT-TM-TIR		
Ls 型	<i>ctg1105.25</i>			945	CT-TM-TIR	
	<i>ctg4463.3</i>	1 030	CT-TM-TIR			
	<i>ctg169.28</i>	725	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg169.30</i>	723	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg169.29</i>	723	SP-LRR(6)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg109.1</i>	737	SP-LRR(5)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg18.55</i>	735	LRR(9)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg1513.3</i>	455	LRR(1)-CT-TM-TIR			
	<i>ctg1513.5</i>	733	SP-LRR(10)-CT-TM-TIR			
	TLR 样蛋白 TLR-like protein	无 TM 结构域 No TM domain	<i>ctg681.6</i>	409	SP-LRR(4)-TIR	
<i>ctg242.33</i>			615	LRR(9)-TIR		
无 TIR 结构域 No TIR domain		<i>ctg58.58</i>	558	LRR(6)-TM		
		<i>ctg375.2</i>	601	SP-LRR(4)-TM		
		<i>ctg730.9</i>	630	SP-LRR(7)-TM		
		<i>ctg375.3</i>	855	LRR(5)-TM		
		<i>ctg356.23</i>	239	TM-TIR		
无 LRR 结构域 No LRR domain		<i>ctg1472.2</i>	96	TIR		
		<i>ctg1184.1</i>	466	SP-NT-LRR(8)		

注: LRR: 亮氨酸重复序列; TM: 跨膜结构域; TIR: TIR 结构域; SP: 信号肽; CT: LRR 的 C 末端; NT: LRR 的 N 末端。

Note: LRR: Leucine-rich repeat; TM: Transmembrane domain; TIR: Toll/interleukin-1 receptor domain; SP: Signal peptide; CT: C-terminus of the LRR; NT: N-terminus of the LRR.

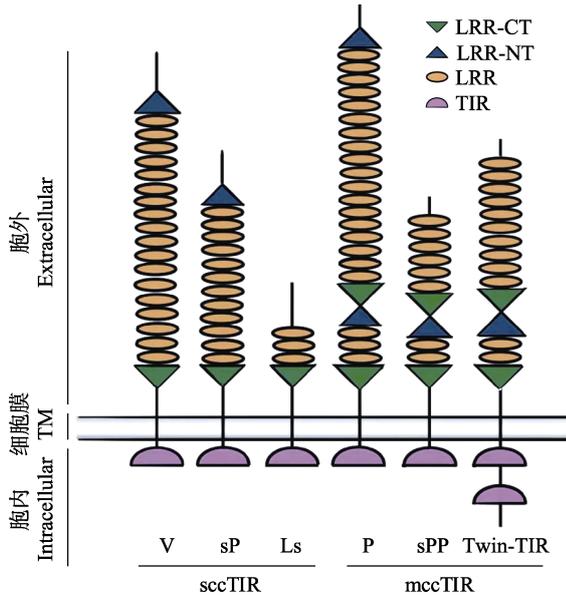


图 1 不同亚类 TLR 蛋白结构域模式

Fig.1 Pattern of protein domains in different subtype of TLRs

LRR: 亮氨酸重复序列; LRR-CT: LRR 的 C 末端;
 LRR-NT: LRR 的 N 末端; TIR: TIR 结构域。
 LRR: Leucine-rich repeat; LRR-CT: C-terminus of the LRR;
 LRR-NT: N-terminus of the LRR; TIR: Toll/interleukin-1 receptor domain.

表达较低($P>0.05$), 而 *ctg1228.10* (P 型)基因在各组织中广泛表达, 表达水平不存在显著性差异。TLR 基因成体组织表达模式与其结构特征未表现出相关性。

2.5 感染弧菌后缙蛭 TLR 基因响应分析

根据转录组中基因表达水平数据, 绘制 TLR 基因表达热图(图 4A), 可以看出, 在 PBS 对照组中, 42 个基因中 41 个基因均有表达(FPKM>1), 但不同基因表达模式有明显的差别, 有些基因只在 1 种组织(鳃或肝胰腺)中明显表达, 有些基因在 2 种组织(鳃和肝胰腺)中均明显表达。如 *ctg1184.1* 在肝胰腺中高表达(PBS_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 1 672、1 370 和 2002), 鳃中几乎不表达(PBS_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 0.027、0 和 0.029); *ctg2.41* 在鳃中明显表达(PBS_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 3.04、9.33 和 12.97), 肝胰腺中几乎不表达(PBS_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 0.49、0.43 和 0.07), 而 *ctg356.25* 在鳃和肝胰腺中均有表达(PBS_G 组 3 个重复 FPKM 值分别为 2.86、2.77 和 2.23; PBS_H 组 3 个重复 FPKM 值分别为 6.01、3.08 和 1.43)。在弧菌感染实验组中, 一些 TLR 基因在弧菌感染 12 h 和/或 48 h 后在鳃或肝胰腺中的表达量发生了变化, 根据差异表达基因筛选标准, 共有 9 个 TLR 基因在鳃或肝胰腺中的表达量发生了显著变化。差异基因表达热图(图 4B)显示, 感染弧菌后, 5 个基因(*ctg118.25*、*ctg118.26*、*ctg356.25*、*ctg774.6* 和 *ctg681.6*)在鳃组织中表达量上调, 前 4 个基因在感染 12 h 变化较显著, 仅 *ctg681.6* 在感染 48 h 变化较显著; *ctg1513.5* 在感染弧菌后的鳃组织表达

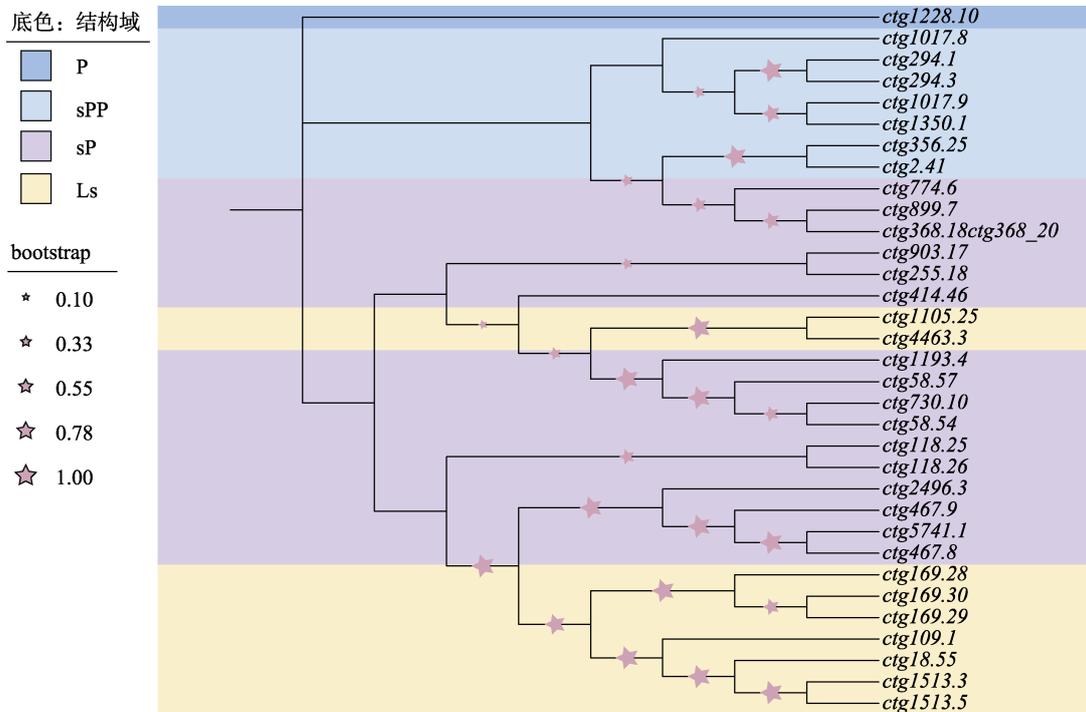


图 2 缙蛭 32 个完整 TLR 的分类及系统发育树

Fig.2 Classification and phylogenetic tree of 32 complete TLRs identified in the genome of *S. constricta*

表 3 软体动物 TLR 基因的分类
Tab.3 Classification of TLR genes in molluscs

物种 Species	单半胱氨酸簇 TLR sccTLR			多半胱氨酸簇 TLR mccTLR			未分类 Unclassified TLR 样蛋白 TLR-like protein	总计 Total
	V-type	Ls-type	sP-type	sPP-type	P-type	Twin-TIR		
	石鳖 <i>Acanthopleura granulata</i>	1	12	7	5	1	1	3
中国真蛸 <i>Octopus sinensis</i>	1	8	4	3	1	—	—	17
加州海兔 <i>Aplysia californica</i>	—	1	33	1	3	—	10	48
霸王莲花青螺 <i>Lottia gigantea</i>	—	4	7	2	2	—	1	16
福寿螺 <i>Pomacea canaliculata</i>	2	40	8	13	—	1	8	72
缢蛏 <i>Sinonovacula constricta</i>	—	9	16	7	1	—	9	42
美洲牡蛎 <i>Crassostrea virginica</i>	1	36	73	5	2	2	11	130
长牡蛎 <i>Crassostrea gigas</i>	4	13	55	3	2	—	6	83
栉孔扇贝 <i>Chlamys farreri</i>	—	23	25	5	—	1	5	59
马氏珠母贝 <i>Pinctada fucata</i>	1	18	52	12	2	—	11	96

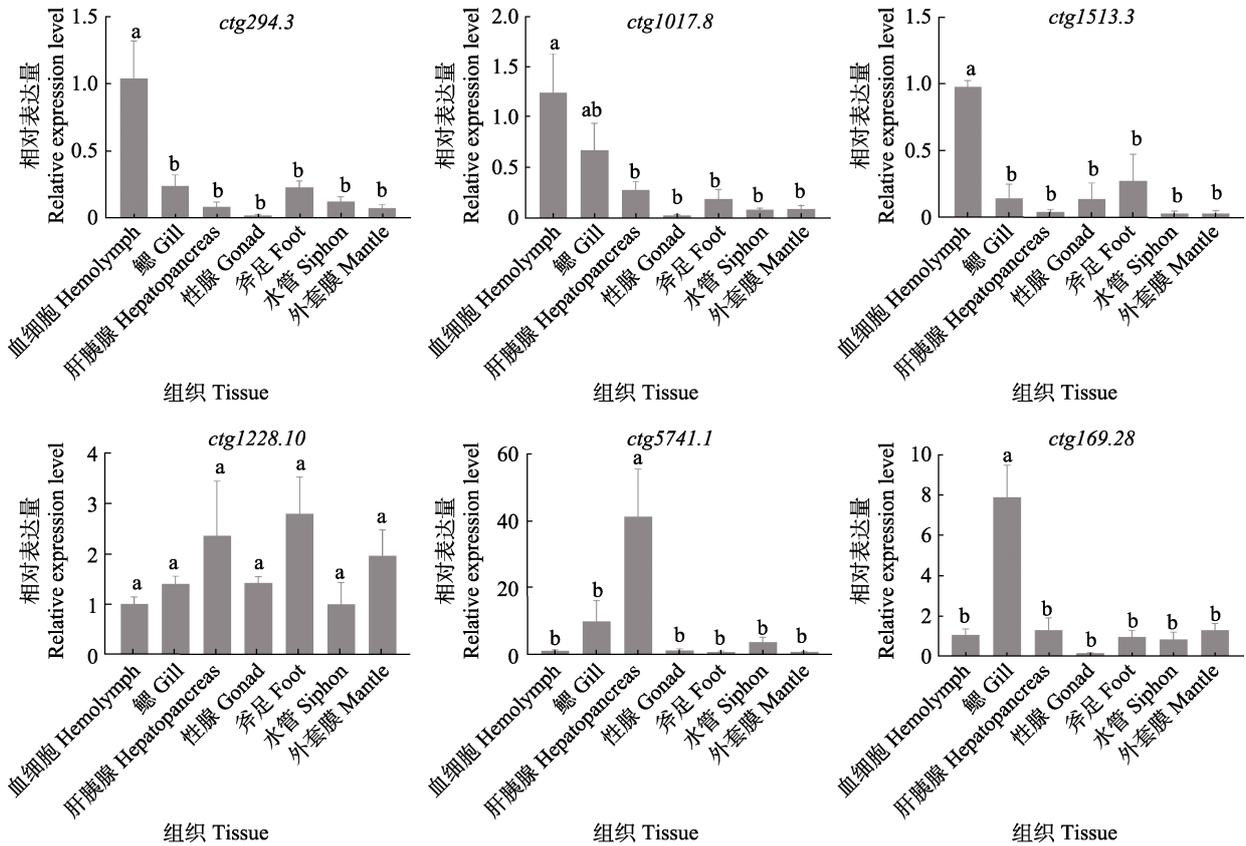


图 3 缢蛏 6 个 TLR 基因在不同组织中的相对表达水平
Fig.3 Relative expression level of six TLR genes in the different tissues of *S. constricta*

相同字母代表差异不显著($P>0.05$), 不同字母代表差异显著($P<0.05$)。

The same letters indicate no significant difference ($P>0.05$), while different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

量下调且 12 h 变化较显著; *ctg903.17*、*ctg467.9* 和 *ctg2496.3* 在弧菌感染后的肝胰腺中表达量显著变化,

其中, *ctg2496.3* 和 *ctg467.9* 表达量下调且 48 h 较为显著, *ctg903.17* 表达量上调且 12 h 较为显著。

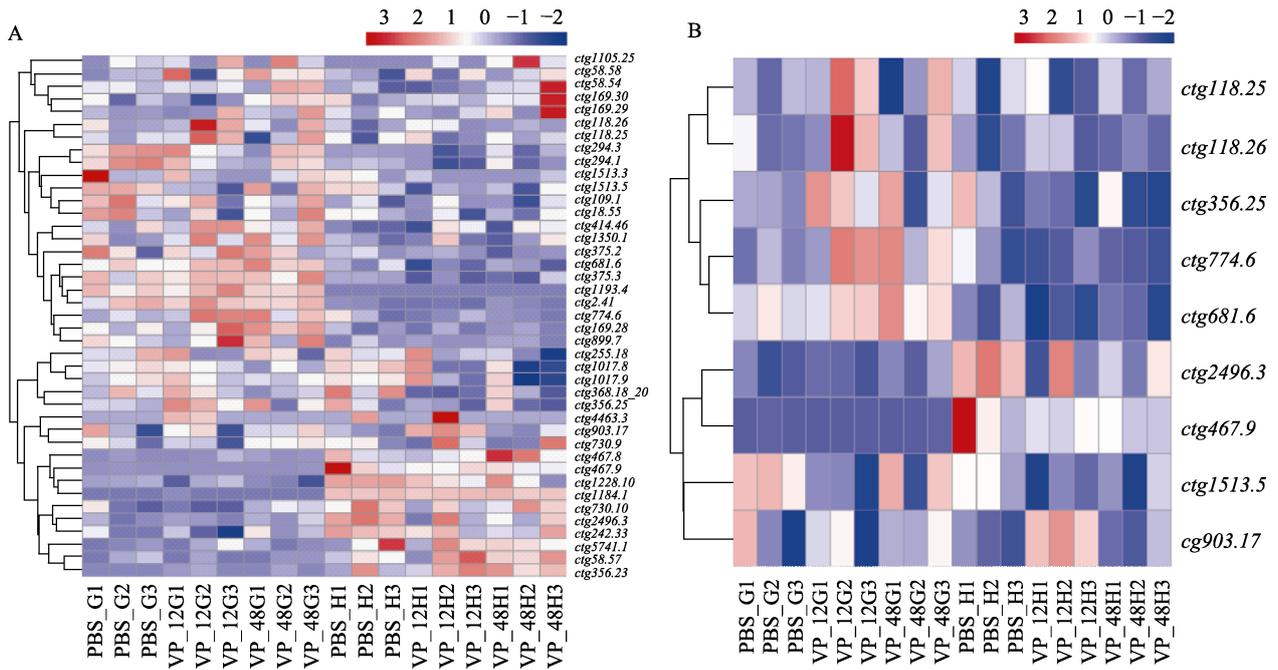


图4 *TLR* 基因在鳃和肝胰腺中的表达量热图(A)和不同组间差异表达基因的表达量热图(B)

Fig.4 Heat map of *TLR* expression level in gill and hepatopancreas (A) and heat map of genes differentially expressed between different groups (B)

PBS_G: 对照组鳃组织; PBS_H: 对照组肝胰腺; VP_12G: 副溶血弧菌感染 12 h 鳃组织;

VP_48G: 副溶血弧菌感染 48 h 鳃组织; VP_12H: 副溶血弧菌感染 12 h 肝胰腺; VP_48H: 副溶血弧菌感染 48 h 肝胰腺。

PBS_G: Gill of control group; PBS_H: Hepatopancreas of control group; VP_12G: Gill of *Vibrio parahaemolyticus* (VP) infection for 12 h; VP_48G: Gill of VP infection for 48 h; VP_12H: Hepatopancreas of VP infection for 12 h; VP_48H: Hepatopancreas of VP infection for 48 h.

3 讨论

3.1 缢蛏 *TLR* 家族基因的鉴定及分类

在长期进化过程中,海洋无脊椎动物已进化出独特的免疫防御体系,如通过免疫基因的大量扩张等策略来适应环境。*TLR* 是模式识别受体家族中的重要一员,它可以特异地识别病原体相关的分子模式,激活信号级联反应,释放各种细胞因子和干扰素来消除病原微生物,在抵御病原微生物过程中发挥重要作用。本研究利用基因组数据鉴定了缢蛏的 *TLR*,并对其进行了特征分析和分类。和大多数软体动物一样,缢蛏基因组中的 *TLR* 数目也发生了显著性扩张,共鉴定出 42 个 *TLR*,其中 33 个 *TLR* 具有 LRR 结构域,跨膜结构域和胞内 TIR 结构域,为典型的 *TLR* 蛋白,而剩余的 9 个 *TLR* 结构域不完整,称为 *TLR* 样蛋白,可能是基因组序列不完整,或是基因长期进化过程中结构域丢失造成的。

根据 *TLR* 蛋白结构域注释及系统发育分析,缢蛏的 *TLR* 分为 *mccTLR* 和 *sccTLR* 两大类,*mccTLR* 进一步分为 P 型和 sPP 型,而 *sccTLR* 进一步分为 Ls

和 sP 型,缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 *TLR* (表 3)。*mccTLR* 典型的特征为 LRR 被 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域分隔,而 *sccTLR* 中单个 LRR-NT 和 LRR-CT 结构域位于典型的 LRR 两侧。由于结构上的差异,*mccTLRs* 和 *sccTLRs* 一直被认为具有独立的起源(Luo *et al*, 2000)。从图 2 可以看出, sPP、sP 和 Ls 型 *TLR* 在缢蛏中均发生明显的扩张现象,其中 sP 型 *TLR* 的扩张占主导地位,这与长牡蛎 *TLR* 的扩张现象一致(Zhang *et al*, 2015)。缢蛏中 *TLR* 的扩张现象证实了 *TLR* 在宿主免疫防御中功能的多样化和复杂性。

为进一步了解软体动物不同类型 *TLR* 的扩张现象,根据 Gerdol 等(2017)提出的 *TLR* 分类方法,本研究对软体动物 4 个纲 10 个代表物种的 *TLR* 进行分类。P 型 *TLR* 与昆虫 Toll 具有高度的结构相似性,支持所有无脊椎动物 P 型 *TLR* 共同起源的假设(Toubiana *et al*, 2013)。软体动物中仅有少量的 P 型 *TLR* (表 3),如缢蛏和长牡蛎基因组中分别有 1 个和 2 个 P 型 *TLR*,表明这类 *TLR* 在软体动物中没有经历过扩张。先前的研究表明, sPP 型 *TLR* 是一个基因

数目相对较少的 TLR 类型,如长牡蛎中仅有 2 个 sPP 型 TLR (Zhang *et al*, 2015); 在这 10 种软体动物中, sPP 型 TLR 数量不等, 在 1~13 个之间, 数目变化较大, 马氏珠母贝和福寿螺中 sPP 型 TLR 数量分别为 12 和 13 个。目前, sPP 型 TLR 在软体动物中的功能尚不清楚。Twin-TIR 型 TLR 为 mccTLR 的新成员, 其存在 2 个连续的胞内 TIR 结构域, 三角帆蚌 (*Hyriopsis cumingii*) Toll-2 为贝类中发现的第 1 个 Twin-TIR 型 TLR, 其能够通过诱导 AMP 的表达参与抗菌免疫反应(Ren *et al*, 2014)。目前, 仅在少数软体动物中发现 Twin-TIR 型 TLR。sccTLR 为起源较晚的 TLR 类群。与 P 型 TLR 类似, V 型 TLR 与其他动物门包括脊椎动物门中发现的 sccTLR 也显示出惊人的相似性(Gerdol *et al*, 2017), 而在软体动物中, 仅在少数动物中鉴定出少量的 V 型 TLR, 缢蛏基因组中未发现 V 型 TLR。除此之外, sP 和 Ls 型 TLR 作为软体动物中数目最多的 TLR 类群, 在 10 种软体动物中均发生了不同程度的扩张, 可能是软体动物长期应对复杂多变的环境进化出的一类特殊的免疫机制, 然而这类 TLR 具体的作用机制目前尚不清楚。根据 Gerdol 等(2017)提出的 TLR 分类原则, 我们还发现了一些 TLR 蛋白不能归类到现有的 TLR 类型, 定义为 TLR 样蛋白, 其分类原则和功能有待进一步研究。综上所述, mccTLR 作为起源古老的 TLR 类群, 在无脊椎动物中的分布范围很广, 在软体动物中没有经历大规模的扩张, 而起源较晚的 sccTLR 类群在软体动物的进化中发生了大规模的扩张。本研究结果丰富了双壳类 TLR 的信息, 并为进一步研究 TLR 在缢蛏非特异性免疫中的功能奠定了基础。

3.2 缢蛏 TLR 基因在成体组织中的表达特征

作为重要的模式识别受体, TLR 在动物非特异性免疫防御中发挥重要作用。在软体动物中, 尽管不同的 TLR 一般在各个组织都有表达, 但它们的表达水平有显著差异。如长牡蛎 *CgToll1* 和 *CgTLR6*、皱纹盘鲍(*Haliotis discus discus*) *AbTLR-A*、栉孔扇贝 *CfToll-1*、厚壳贻贝(*Mytilus coruscus*) *McTLR2* 及菲律宾蛤仔 8 个 *RpTLR* 基因主要在血细胞中表达(Li *et al*, 2019; Priyathilaka *et al*, 2019; Qiu *et al*, 2007; Ren *et al*, 2021; Wang *et al*, 2016; Zhang *et al*, 2011), 而厚壳贻贝 *McTLRj* 在肝胰腺中表达水平最高, 其次是鳃和血细胞, 而性腺和外套膜中表达量中等, 肝胰腺和闭壳肌中表达较弱(Xu *et al*, 2019)。皱纹盘鲍 *AbTLR-B* 主要在鳃中表达(Priyathilaka *et al*, 2019), 三角帆蚌的 *HcToll1* 在血细胞、肝胰腺、鳃和外套膜中高表达(Ren

et al, 2013), 而三角帆蚌另一个新型 *HcTLR* 在所有组织中均广泛表达, 在鳃和肝胰腺中表达水平较高(Yin *et al*, 2021)。为了检测缢蛏 TLR 基因的组织表达规律, 我们从结构域编码完整的 TLR 基因中随机选择 6 个 TLR, 利用 qRT-PCR 技术检测其在健康缢蛏组织中的表达模式, 结果显示, *ScTLR* 在所有检测组织中广泛表达, 其中, 血细胞、鳃和肝胰腺中表达水平较高, 而其他组织表达量差异不显著, 这些 *ScTLR* 基因的不同表达谱可能暗示它们在缢蛏中发挥的功能不同。不同的 TLR 基因在血细胞或鳃中不同程度地呈现高表达水平, 也证实了血细胞和鳃是软体动物中主要的免疫组织(Xu *et al*, 2019), 同时也表明 *ScTLR* 可能在缢蛏的非特异性免疫防御中发挥重要作用。

3.3 缢蛏 TLR 基因对弧菌感染的响应

根据缢蛏转录组数据, 我们对 TLR 基因的表达量进行了分析, 在鉴定的 42 个 TLR 基因中, 41 个基因在鳃或者肝胰腺中有表达, 但表达量各不相同且具有明显的组织差异, 这反映了鳃和肝胰腺组织在缢蛏免疫防御反应中的分工。此外, 有 9 个 TLR 在弧菌感染前后在鳃和肝胰腺中表达量发生显著变化, 其中 6 个 TLR 表达量显著上调, 可能在抵御弧菌的入侵过程中发挥了重要的作用, 这与栉孔扇贝和厚壳贻贝中 TLR 的表达模式一致(Lu *et al*, 2016; Xu *et al*, 2019), 而对于表达量显著下调的 3 个 TLR, 其在抵御病原菌的入侵中可能发挥了不同作用。总之, 这些结果表明, 在弧菌胁迫下缢蛏可能通过鳃和肝胰腺两种重要免疫器官中不同 TLR 基因的表达, 协同控制下游免疫相关基因的表达, 以达到免疫防御的效果。

4 结论

本研究基于缢蛏全基因组序列, 系统地鉴定出 42 个 *ScTLR* 基因, 其中, 33 个编码典型的 TLR 蛋白, 其他的 9 个为 TLR 样蛋白; 根据其蛋白结构域的位置特点将其进一步分为 P 型、sPP 型、sP 型和 Ls 型 4 种类型。此外, 通过与 9 种软体动物 TLR 蛋白比较, 在缢蛏基因组中未发现其他软体动物中存在的 V 型和 Twin-TIR 型 TLR; 起源古老的 mccTLR 类群在软体动物中没有经历大规模的扩张, 而起源较晚的 sccTLR 类群却发生了大规模的扩张。TLR 基因组织表达水平检测结果显示, 缢蛏 TLR 在血细胞或鳃组织中高表达, 进一步证实血细胞和鳃是软体动物中主要的免疫组织。最后, 弧菌胁迫下缢蛏鳃和肝胰腺转录组数据显示, 41 个 TLR 基因在鳃和肝胰腺中表达量各不相同且具有明显的组织差异, 这反映了鳃和肝

胰腺组织在缢蛏免疫反应中的分工;缢蛏可能通过鳃和肝胰腺 2 种重要免疫器官中不同 *TLR* 基因的表达,协同控制下游免疫相关基因的表达,以达到免疫防御的效果。本研究结果为深入探讨不同 *TLR* 基因在缢蛏天然免疫中发挥的作用提供了基础。

参 考 文 献

- BAI C M, XIN L S, WANG C M. Malacoherpesviruses and their associated damages to mollusk aquaculture industry. *Progress in Fishery Sciences*, 2021, 42(1): 214–226 [白昌明, 辛鲁生, 王崇明. 软体动物疱疹病毒及其对贝类养殖产业的危害. *渔业科学进展*, 2021, 42(1): 214–226]
- BRENNAN J J, GILMORE T D. Evolutionary origins of Toll-like receptor signaling. *Molecular Biology and Evolution*, 2018, 357: 1576–1587
- DONG Y, ZENG Q, REN J, *et al.* The chromosome-level genome assembly and comprehensive transcriptomes of the razor clam (*Sinonovacula constricta*). *Frontiers in Genetics*, 2020, 11: 664
- GERDOL M, VENIER P, EDOMI P, *et al.* Diversity and evolution of TIR-domain-containing proteins in bivalves and Metazoa: New insights from comparative genomics. *Developmental and Comparative Immunology*, 2017, 70: 145–164
- GORBUSHIN A M. Toll-like signaling pathway in the transcriptome of *Littorina littorea*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 106: 640–644
- KONG X H, WANG S S, DONG Y H, *et al.* Analysis of expression characteristics of related genes in response to acute thermal stress in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Progress in Fishery Sciences*, 2022, 43(2): 194–203 [孔祥辉, 王莎莎, 董迎辉, 等. 缢蛏急性高温胁迫应答主要候选基因的表达特征分析. *渔业科学进展*, 2022, 43(2): 194–203]
- KUMAR S, STECHER G, TAMURA K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 2016, 337: 1870–1874
- LEMAITRE B, REICHHART J M, HOFFMANN J A. *Drosophila* host defense: Differential induction of antimicrobial peptide genes after infection by various classes of microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(26): 14614–14619
- LETUNIC I, BORK P. Interactive Tree of Life (iTOL) v3: An online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Research*, 2016, 44(W1): W242–W245
- LEULIER F, LEMAITRE B. Toll-like receptors: Taking an evolutionary approach. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(3): 165–178
- LI Y F, LIU Y Z, CHEN Y W, *et al.* Two Toll-like receptors identified in the mantle of *Mytilus coruscus* are abundant in haemocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 90: 134–140
- LIAO Y, SMYTH G K, SHI W. FeatureCounts: An efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, 2014, 30(7): 923–930
- LOVE M I, HUBER W, ANDERS S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 2014, 15(12): 550
- LU Y, ZHENG H, ZHANG H, *et al.* Cloning and differential expression of a novel Toll-like receptor gene in noble scallop *Chlamys nobilis* with different total carotenoid content. *Fish and Shellfish Immunology*, 2016, 56: 229–238
- LUO C H, ZHENG L B. Independent evolution of Toll and related genes in insects and mammals. *Immunogenetics*, 2000, 512: 92–98
- MEDZHITOV R, PRESTON-HURLBURT P, KOPP E, *et al.* MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Molecular Cell*, 1998, 22: 253–258
- MEDZHITOV R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 2007, 449(7164): 819–826
- MENG Y, DAI W, LIN Z, *et al.* Expression and functional characterization of peptidoglycan recognition protein-S6 involved in antibacterial responses in the razor clam *Sinonovacula constricta*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2022, 129: 104331
- MORTAZAVI A, WILLIAMS B A, MCCUE K, *et al.* Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, 2008, 57: 621–628
- NIU D H, JIN K, WAN L, *et al.* Molecular characterization and expression analysis of four cathepsin L genes in the razor clam, *Sinonovacula constricta*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013a, 35(2): 581–588
- NIU D H, JIN K, WANG L, *et al.* Identification of cathepsin B in the razor clam *Sinonovacula constricta* and its role in innate immune responses. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013b, 41(1): 94–99
- PRIYATHILAKA T T, BATHIGE S, LEE S, *et al.* Transcriptome-wide identification, functional characterization, and expression analysis of two novel invertebrate-type Toll-like receptors from disk abalone (*Haliotis discus discus*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2019, 84: 802–815
- QIU L, SONG L, XU W, *et al.* Molecular cloning and expression of a Toll receptor gene homologue from Zhikong scallop, *Chlamys farreri*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2007, 22(5): 451–466
- REN Q, LAN J F, ZHONG X, *et al.* A novel Toll like receptor with two TIR domains (HcToll-2) is involved in regulation of antimicrobial peptide gene expression of *Hyriopsis cumingii*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2014, 45(1): 198–208
- REN Q, ZHONG X, YIN S W, *et al.* The first Toll receptor from the triangle-shell pearl mussel *Hyriopsis cumingii*. *Fish and Shellfish Immunology*, 2013, 34(5): 1287–1293
- REN Y, LIU H, FU S, *et al.* Transcriptome-wide identification and characterization of Toll-like receptors response to *Vibrio*

- anguillarum* infection in Manila clam (*Ruditapes philippinarum*). *Fish and Shellfish Immunology*, 2021, 111: 49–58
- SATAKE H, SEKIGUCHI T. Toll-like receptors of deuterostome invertebrates. *Frontiers in Immunology*, 2012, 3: 34–40
- THOMPSON J D, HIGGINS D G, GIBSON T J. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 1994, 22(22): 4673–4680
- TOUBIANA M, GERDOL M, ROSANI U, *et al.* Toll-like receptors and MyD88 adaptors in *Mytilus*: Complete cds and gene expression levels. *Developmental and Comparative Immunology*, 2013, 40(2): 158–166
- WANG L, CHAN J L, LI Q, *et al.* Evolutionary history of the Toll-like receptor and Myd88 in molluscs. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2021, 52(4): 936–946 [王璐, 产久林, 李倩, 等. 海洋贝类 Toll 样受体及其接头蛋白 MyD88 的分子进化研究. *海洋与湖沼*, 2021, 52(4): 936–946]
- WANG W, ZHANG T, WANG L, *et al.* A new non-phagocytic TLR6 with broad recognition ligands from Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2016, 65: 182–190
- WU Y, ZHENG Y, LI Y, *et al.* Two fibrinogen-related proteins (FREPs) in the razor clam (*Sinonovacula constricta*) with a broad recognition spectrum and bacteria agglutination activity. *Developmental and Comparative Immunology*, 2021, 121: 104075
- XU K, ZHANG Z, XU Z, *et al.* A novel invertebrate Toll-like receptor is involved in TLR mediated signal pathway of thick shell mussel *Mytilus coruscus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 2019, 97: 11–19
- XU X R, LIAO K, SHI P, *et al.* Involvement of a novel Ca²⁺-independent C-type lectin from *Sinonovacula constricta* in food recognition and innate immunity. *Fish and Shellfish Immunology*, 2020, 104: 374–382
- YIN S, CHEN J, ZHU M, *et al.* Characterization of a novel Toll-like receptor and activation NF-kappaB signal pathway in triangle sail mussel *Hyriopsis cumingii*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2021, 255: 110608–110617
- ZHANG L, LI L, GUO X, *et al.* Massive expansion and functional divergence of innate immune genes in a protostome. *Scientific Reports*, 2015, 5: 8693–8703
- ZHANG L, LI L, ZHANG G. A *Crassostrea gigas* Toll-like receptor and comparative analysis of TLR pathway in invertebrates. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011, 30(2): 653–660
- ZHANG Y X, SU J, FAN J F, *et al.* Outbreaks of vibriosis in mariculture shellfish and its research progress. *Marine Environmental Science*, 2020, 39(3): 480–487 [张颖雪, 苏洁, 樊景凤, 等. 海水养殖贝类弧菌病流行暴发及其环境影响因素研究进展. *海洋环境科学*, 2020, 39(3): 480–487]
- ZHAO X, DUAN X, WANG Z, *et al.* Comparative transcriptome analysis of *Sinonovacula constricta* in gills and hepatopancreas in response to *Vibrio parahaemolyticus* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 2017, 67: 523–535

(编辑 冯小花)

Genome-Wide Identification of Toll-Like Receptor Family Genes in *Sinonovacula constricta* and Their Expression in Response to *Vibrio parahaemolyticus* Infection

DU Bobo^{1,3}, YAO Lu^{1,3}, LI Zhiping^{1,3}, DONG Yinghui², REN Jianfeng^{1,3}①

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China; 2. Key Laboratory of Aquatic Germplasm Resource of Zhejiang, College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315000, China; 3. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract Molluscs do not have adaptive immune cells and corresponding antibodies in their bodies. They mainly rely on the innate immune system to protect themselves from various pathogens and foreign substances to maintain normal life activities. Pattern recognition receptors (PRRs) first sense pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) during the innate immune response, triggering specific signaling pathways and resisting pathogenic invasion. Toll-like receptors (TLRs) are widely studied PRRs

① Corresponding author: REN Jianfeng, E-mail: jfren@shou.edu.cn

and play important roles in the innate immunity of invertebrates. The first TLR was found in *Drosophila*, which activated the transcription factor NF- κ B signaling pathway to guide early embryonic development. Later, it was proved to play an important role in the immunity of *Drosophila*. A typical TLR protein includes three protein domains, the extracellular domain containing two to 45 leucine-rich repeats (LRRs), the transmembrane domain, and the intracellular region containing a TIR (Toll/interleukin-1 receptor) domain. According to their structure variation in the LRR extracellular domain, TLRs can be divided into two types, namely single cysteine cluster TLR (sccTLR) and multiple cysteine cluster TLR (mccTLR).

The razor clam *Sinonovacula constricta* is an economically important bivalve species and one of the four traditional mariculture mollusks in China. However, deterioration of the rearing environment and various bacterial and viral disease outbreaks have caused significant economic losses to the *S. constricta* industry. Therefore, a deep understanding of the immune defense mechanisms in *S. constricta* would help implement effective disease resistance strategies. In this study, we identified all TLR genes in *S. constricta* using whole genomic resources. Firstly, we identified the *S. constricta* proteins with both TIR domain (PF01582) and LRR domain (PF13855) using the InterProScan. Secondly, we further searched the whole genome DNA sequence using the TBLASTN program and the TIR-LRR protein sequences as query to identify missed *TLR* genes during genome annotation. The TLR protein domains identified were analyzed with the SMART software (<http://smart.embl-heidelberg.de/>). The TLR proteins with incomplete domains were further corrected with the FGENESH⁺ program on the Softberry website (<http://www.softberry.com/>). Finally, a total of 42 *S. constricta* *TLR* (*ScTLR*) genes were identified. Among them, 33 genes encode typical TLR proteins with three domains, and the remaining nine genes encode TLR-like proteins lacking some domains. The typical *S. constricta* TLR proteins were classified into two types and four subtypes based on the protein domain structure characteristics. The type mccTLR includes one P-TLR and seven sPP-TLRs, while the type sccTLR includes 16 sP-TLRs and nine Ls-TLRs. Furthermore, the type and number of *TLR* genes were compared among ten species from four classes of mollusks, including *S. constricta*. The results showed that two types of *TLR* genes, V-type and Twin-TIR TLR, identified in other mollusks were not found in the *S. constricta* genome. The number of TLR genes varied dramatically between different species, wherein the owl limpet (*Lottia gigantea*) and the common octopus (*Octopus sinensis*) possessed 16 and 17 *TLR* genes, respectively, while the American oyster (*Crassostrea virginica*) owned more than 130 *TLR* genes. Even in the same taxonomic genus, different species had a vastly different number of *TLR* genes, such as the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), which belongs to the same genus as the American oyster, and possessed 83 *TLR* genes, obviously less than the American oyster. Evolutionarily, the anciently originated *mccTLR* genes in mollusks did not expand in number, while the recently originated *sccTLR* genes largely expanded in number. The qRT-PCR tissue-specific expression analysis showed that six *TLR* genes randomly selected were expressed in seven tissues, including the hemolymph, gill, hepatopancreas, gonad, foot, mantle, and siphon, being highly expressed in the hemolymph, gill, and hepatopancreas. Finally, the razor clams were infected with *Vibrio parahaemolyticus*, and the gill and hepatopancreas tissues were collected at 12 h and 24 h post-injection (hpi) for further transcriptome analysis. The results showed that nine *TLR* genes were differentially expressed in the gill or hepatopancreas before and after *V. parahaemolyticus* injection. Six genes (*ctg118.25*, *ctg118.26*, *ctg356.25*, *ctg774.6*, *ctg681.6*, and *ctg1513.5*) were differentially expressed in gill at 12 hpi or 48 hpi, in which only *ctg1513.5* was down-regulated and the other five were up-regulated. Three genes (*ctg467.9*, *ctg2496.3*, and *ctg903.17*) were differentially expressed in the hepatopancreas at 12 hpi or 48 hpi, wherein *ctg467.9* and *ctg2496.3* were down-regulated, and *ctg903.17* was up-regulated. In summary, our findings will pave the way for investigating the functions of *TLR* genes in the innate immune response to different pathogens.

Key words *Sinonovacula constricta*; Toll-like receptors; *Vibrio* challenge; Expression analysis